

« Role of semen infected leukocytes in HIV mucosal transmission – Experimental model of SIVmac251 infection in *Macaca fascicularis* ».

Titre en français : « Rôle des leucocytes infectés du sperme dans la transmission muqueuse du VIH – Modèle expérimental de l'infection par le SIVmac251 de *Macaca fascicularis*. »

Aujourd'hui, plus de 80% des nouvelles infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) se produisent au cours d'un rapport sexuel, avec une transmission du virus par voie muqueuse. Le sperme constitue donc une source majeure de virus à l'échelle mondiale. Le sperme d'hommes infectés par le VIH contient le virus sous deux formes : des particules virales libres et des cellules infectées, principalement des leucocytes.

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer le passage du virus à travers la barrière muqueuse, qu'il s'agisse d'une muqueuse génitale (cervico-vaginale, pénienne ou urétrale) ou intestinale (muqueuse anale ou rectale). Toutefois, une grande majorité des études qui ont été menées jusqu'à présent se sont concentrées sur le rôle des particules virales libres, et celui des cellules infectées demeure mal compris.

Notre laboratoire a montré *in vivo* chez le Macaque que des cellules immunitaires infectées par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) peuvent à elles-seules transmettre efficacement l'infection, et que celles-ci parviendraient à traverser la muqueuse et disséminer à l'intérieur de l'organisme de femelles macaques (Sallé *et al.*, 2010, J Infect Dis). Néanmoins, les cellules utilisées lors de cette étude provenaient de la rate d'un animal infecté par le VIS, et non du sperme. Or les splénocytes diffèrent des leucocytes présents dans le sperme, à la fois par la proportion relative de chaque sous-type cellulaire (lymphocytes T, macrophages et cellules dendritiques), et par leur phénotype.

Le projet de cette thèse est d'étudier le rôle des leucocytes infectés présents dans le sperme de macaque dans la transmission muqueuse du VIS/VIH. Ainsi, trois axes d'étude principaux ont été définis:

1. L'étude des leucocytes présents dans le sperme de macaque cynomolgus, et de l'influence que peut avoir l'infection par le VIS sur eux.
2. La nature des cellules immunitaires infectées présentes dans le sperme de macaque, et leur dynamique au cours de l'infection par le VIS.
3. L'étude du pouvoir infectieux des deux principales cellules cibles pour le VIS/VIH : les lymphocytes CD4+ (LT CD4+) et les macrophages, *in vitro* et *in vivo*, après inoculation rectale et vaginale à des macaques.

Tout d'abord, afin de récolter le sperme de macaques matures sexuellement, nous avons mis au point une technique d'électroéjaculation efficace et reproductible. Nous avons constaté que le sperme de macaque présente des caractéristiques similaires au sperme humain, notamment la nature des leucocytes présents et leur proportion relative.

Le phénotype des leucocytes présents a été caractérisé par cytométrie en flux. Différents panels d'anticorps ont été mis au point, afin d'étudier les différentes sous-populations leucocytaires (lymphocytes T, monocytes/macrophages et cellules dendritiques), leur état d'activation (expression de CD69 et HLA-DR), de différenciation (expression de CD95 et CD28) et l'expression de différents marqueurs connus pour être impliqués dans le profil migratoire des leucocytes (CCR5, CXCR4, CXCR3, LFA-1, Mac-1).

Toutes les cellules cibles de VIS/VIH sont présentes dans le sperme de macaque, à tous les stades de l'infection : des LT CD4⁺ centrales mémoire, activées et exprimant CCR5 et/ou CXCR4, les principaux co-récepteurs pour le virus ; des macrophages présentant un phénotype tissulaire et exprimant le CD4 (le récepteur du VIS/VIH) et CCR5 ; des cellules dendritiques et notamment des cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs). De plus, l'infection par le VIS induit des changements significatifs dans la dynamique de certains de ces types cellulaires et dans leur expression de marqueurs d'activation, d'adhésion et de migration susceptibles d'augmenter la production virale et leur pouvoir infectieux si les cellules les expriment sont infectées.

D'autre part, l'infection par le VIS induit un état inflammatoire important au cours de la phase aiguë, susceptible également de moduler le pouvoir infectieux des cellules infectées. Notamment, les concentrations dans le liquide séminal de molécules pro-inflammatoires, telles que IFN- γ , TNF- α , RANTES, IP-10, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15 et IL-18, augmentent significativement et/ou sont corrélées à la charge virale locale et systémique

Nous avons également mesuré la réponse immunitaire innée et adaptative (anticorps anti-VIS et LT CD8⁺ spécifiques de VIS Gag) dans le sperme de macaques infectés. Nous avons montré que les acteurs principaux de cette réponse sont présents dans le sperme de macaques, mais ne semblent pas corrélés à la charge virale séminale en ARN, suggérant qu'ils ne participent pas au contrôle de la réplication virale locale.

Dans un second temps, nous avons développé une technique de tri cellulaire par cytométrie en flux afin d'isoler les LT CD4⁺ et les macrophages du sperme de macaques infectés à différents stades de l'infection (phase aiguë et chronique). La charge virale en copies d'ADN viral a été mesurée dans les deux fractions par real-time PCR quantitative. Nous avons pu montrer que le sperme de macaque contient des LT CD4⁺ et des macrophages infectés, à tous les stades de l'infection. Bien que présent en faibles quantités, l'ADN viral est détectable plus fréquemment dans les LT CD4⁺ que les macrophages.

Par ailleurs, nous avons testé le pouvoir infectieux *in vitro* de ces deux types cellulaires en les cultivant, après tri, en présence d'une lignée cellulaire permissive à l'infection par le VIS (CEMx174). Nous avons observé que les LT CD4⁺ et les macrophages infectés présents dans le sperme de macaques aux stades précoces et tardifs de l'infection sont capables de produire des particules virales infectieuses et transmettre l'infection.

Enfin nous avons testé le pouvoir infectieux des leucocytes du sperme en les inoculant par voie rectale et vaginale à des macaques. Afin de recueillir un nombre important de cellules, nous avons mélangé les leucocytes du sperme de plusieurs macaques prélevés le même jour. Les animaux « donneurs » avaient été infectés à l'aide d'une dose importante de virus et présentant une charge virale plasmatique et

séminale élevées. Le nombre total de leucocytes inoculés était de 300 000 en moyenne, avec un maximum de 2 millions de cellules obtenues.

Nous avons testé trois protocoles différents :

- **Une unique inoculation par voie rectale** d'une fraction contenant les LT CD4+ ou les macrophages du sperme de trois animaux donneurs à un stade très précoce de l'infection (10 jours post-infection) ;
- **Trois inoculations par voie rectale répétées** à deux semaines d'intervalle des leucocytes totaux (toutes cellules CD45+) provenant de trois animaux à des stades plus tardifs (> 1 mois post-infection) ;
- **Quatre inoculations par voie vaginale répétées**, à raison de deux inoculations par semaine, des leucocytes totaux provenant de quatre animaux durant les trois premières semaines post-infection.

A ce jour, aucun animal inoculé n'a développé l'infection. Il est désormais nécessaire de poursuivre ces expériences, en testant en premier lieu la viabilité des leucocytes du sperme après le tri cellulaire, qui peut être traumatique pour les cellules :

- en présence de sécrétions cervico-vaginales, dont le pH bas est susceptible d'altérer leur viabilité *in vivo* ;
- en l'absence d'un pouvoir tampon du liquide séminal, présent dans un éjaculat normal.

Par ailleurs, nous pouvons émettre certaines hypothèses quant à l'absence de transmission de l'infection dans les conditions expérimentales développées au cours de ce travail :

- le nombre de cellules inoculées était relativement réduit, en comparaison avec le nombre de leucocytes trouvés dans un éjaculat humain ;
- l'absence de liquide séminal, qui est susceptible de moduler le pouvoir infectieux du virus associé aux cellules, dans l'inoculum peut diminuer la probabilité de la transmission de l'infection ;
- le pouvoir infectieux des leucocytes du sperme est trop réduit pour que, statistiquement, le nombre d'animaux inoculés soit suffisant pour observer un événement de transmission.

Si le rôle des leucocytes infectés du sperme est confirmé *in vivo*, il sera important à l'avenir de prendre en compte ce mécanisme de transmission dans le développement de nouvelles stratégies préventives de l'infection par le VIH, notamment les microbicides.